

Szérum dipeptidyl-peptidáz-4 enzim aktivitás és T-lymphocyta felszíni CD26 expresszió vizsgálata diabétesz mellituszban

Doktori tézisek

Dr. Varga Tímea

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Professzor Dr. Somogyi Anikó egyetemi tanár, MTA doktora

Konzulens: Dr. Firneisz Gábor Ph.D. egyetemi adjunktus

Hivatalos Bírálók: Dr. Putz Zsuzsanna Ph.D. egyetemi tanársegéd

Dr. Nádas Judit Ph.D

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Gerő László egyetemi tanár, MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Prechl József Ph.D.

Dr. Reismann Péter Ph.D.

Budapest

2012

Bevezetés

A dipeptidyl-peptidáz-4 (DPP-4) enzim szolubilis és membránhoz kötött formában (CD26) fordul elő a szervezetben. Mindkét forma T-sejt aktivációs és T-sejt proliferációt fokozó hatással is bír, rendelkezik DPP-4 aktivitással ezért hasítja és ezzel inaktiválja a szénhidrát bevitelt követően szekretálódott inkretin hormonokat. A jelenleg 2-es típusú diabéteszben (T2DM) használt, a DPP-4 enzim gátlásán alapuló DPP-4 gátlók elsősorban az enzim az inkretinekre gyakorolt hatásának blokkolását használják ki a cukorbetegség gyógyításában. A fehérjét azonban számos betegséggel kapcsolatban vizsgálták. Aktivitásának, a membránhoz kötött forma expressziójának eltérései alapján nyilvánvalóvá vált, hogy alapvető szerepe van többek között a gyulladásos, autoimmun és daganatos folyamatokban is.

Az eddigi kutatások nem fordítottak jelentős figyelmet az enzimaktivitás vizsgálatára 1-es típusú (T1DM) cukorbetegségben. Ugyanakkor ebben a szénhidrát anyagcsere zavarral járó autoimmun megbetegedésben az immunrendszer aktivitásában is szerepet játszó molekulák pontosabb, részletesebb vizsgálata a betegség patomechanizmusának, szűrésének és esetleges prevenciójának szempontjából is különösen fontos lehet. Korábbi irodalmi adatok ismeretében azt feltételeztük, hogy a szénhidrát anyagcsere státusz jellemző, valamint az aktuális hyperglykémia meghatározó lehet az egyes típusú diabéteszes betegekben mért DPP-4 enzimaktivitás értékekre és a szérumban DPP-4 enzimaktivitás változhat a szénhidrát bevitel hatására. Vizsgálataink egy része erre a folyamatra irányult.

Hipotézisünk volt továbbá, hogy az autoimmun háttérű cukorbetegség és a DPP-4 fehérje működése között kapcsolat állhat fenn, melynek igazolása esetén további információk tárhatóak fel a betegség patomechanizmusával kapcsolatban és esetlegesen kibővíthetik az eddigi diagnosztikai és kezelési ismereteket. Tekintettel a T1DM autoimmun jellegére, a DPP-4/CD26 immunológiai folyamatokban játszott szerepére, valamint arra, hogy a szolubilis DPP-4/sCD26 szerepe és kapcsolata a membránhoz kötött CD26-al még nem tisztázott teljesen, a két, lényegileg azonos paraméter (sDPP-4 és lymphocytához kötött CD26) különböző megjelenési formái közötti összefüggést is feltételeztük.

Célkitűzések

1. Meghatározni az éhomi és postprandiális szérumban DPP-4 enzimaktivitást 1-es és 2-es típusú cukorbetegségben valamint egészséges személyekben.
2. Megvizsgálni, hogy a szérumban mérhető szolubilis DPP-4 aktivitás változik-e szénhidrátbevitelre, egészségesekben illetve cukorbetegségben.
3. Van-e összefüggés az éhomi szérumban DPP-4 enzim aktivitás és a szénhidrát háztartással kapcsolatos klinikai laboratóriumi értékek (éhomi plazma glükóz, HbA1C) között T1DM és T2DM betegekben és egészséges személyekben?
4. A vizsgálati eredmények kapcsán a T1DM-ben észlelt emelkedett szérumban DPP-4 aktivitás hátterének vizsgálata.

Tekintettel a T1DM autoimmun jellegére és a DPP-4/CD26 immunológiai folyamatokban játszott szerepére az éhomi szérumban DPP-4 meghatározás mellett célunk volt az immunfolyamatokban részt vevő T lymphocyták felszínéhez kötött és a T-sejtek aktiválásában és proliferációjában is szerepet játszó CD26 expresszió meghatározása mind a CD3+ lymphocyták -majd ezen belül a CD4+ és CD8+ lymphocyták szubpopulációkon T1DM-ben és egészséges személyekben is.

5. Annak vizsgálata, hogy van-e összefüggés az éhomi szolubilis szérumban DPP-4 aktivitás és a lymphocyták membránhoz asszociált CD26 expresszió között autoimmun diabéteszes betegekben.
6. A T1DM-ben zajló autoimmun folyamat markereként megjelenő szigetsejt ellenes antitestek közül az ICA és GADA markerek kimutatása. Annak vizsgálata T1DM-ben, hogy van-e összefüggés:
 - a mért éhomi szérumban DPP-4 enzim aktivitás értékek és a vizsgált autoimmun markerek között autoimmun diabéteszes betegekben?

- van-e összefüggés a vizsgált autoimmun markerek illetve a CD4+ illetve a CD8+ T lymphocytá szubpopulációk felszíni CD26 molekula expressziója között, autoimmun diabéteszes betegekben?

7. Az eredmények ismeretében a DPP-4 enzim lehetséges szerepének meghatározása 1-es típusú diabéteszben.

Beteganyag és módszerek

Vizsgálati beteganyag

Vizsgálati beteganyagunkat 1-es és 2-es típusú cukorbetegségeket valamint egészséges személyeket (CNTRL) alkották.

I. Az éhomi és a postprandialis szérumban DPP-4 enzimaktivitás meghatározására irányuló vizsgálat

Egyes típusú cukorbetegségeket szérumban DPP-4 aktivitását vizsgáltuk éhomi és postprandialis állapotokban. Kontroll csoportként egészséges egyéneket valamint hyperglykémias kontroll csoportként 2-es típusú cukorbetegségeket választottunk.

A vizsgálatban T1DM-, T2DM- és egészséges személyek- összesen 153 személy: 41 T1DM (nő/ff=17/24; kor: 36,39±12,03 év; BMI: 25,25±4,33 kg/m²), 87 T2DM (nő/ff=47/40; kor: 62,96±11,10 év; BMI: 29,49±5,20 kg/m²) és 25 egészséges személy (nő/ff=15/10; kor: 35,48±13,99 év; BMI: 23,24±3,89 kg/m²) vett részt.

Éhomi, majd tesztétkezést követően a postprandialis szérumban DPP-4 enzimaktivitás változást határoztuk meg a vizsgált személyekben. A vizsgálatban a postprandialis szérumban DPP-4 aktivitás vizsgálata során különböző időpontokban 50 egyén esetében (17 T2DM, 15 T1DM és 18 egészséges) a tesztétkezést követően (50g szénhidrát+24g fehérje+12g zsír = 410 kcal) 60 és 120 percnél is történt a szérumból DPP-4 enzimaktivitás meghatározása. Mind a 153 személy esetében az éhomi szérumban DPP-4 enzimaktivitás mellett klinikai laboratóriumi értékek (éhomi plazma glükóz, HbA1C, GOT, GPT, GGT, ALP, Kreatinin, teljes vérkép, CRP) meghatározása is történt.

II. Az emelkedett szérumban DPP-4 aktivitás hátterének vizsgálatára irányuló vizsgálat

Az előző vizsgálatban tapasztalt eredmények - a T1DM csoportban észlelt magasabb szérumban DPP-4 aktivitás - kapcsán további vizsgálatokat végeztünk, amelyek az eredmény hátterének feltárására irányultak. A vizsgálat további részében T1DM betegeket és egészséges személyeket vizsgáltunk. Összesen 98 személy: 48 T1DM beteg: (nő/ff= 20/28; átlagéletkor: 34,4 95% CI:20-60év; BMI: 24,3 95%CI: 19,9-32 kg/m²) és 50 egészséges kontroll személy:

(nő/ffi = 39/11; átlagéletkor: 32,4 95% CI:22-56 év; BMI: 22 95%CI: 18,3-26 kg/m²) vett részt a vizsgálatban.

Az emelkedett szérums DPP-4 aktivitás hátterének vizsgálata során a T1DM betegekben és egészséges személyekben is minden esetben a klinikai laboratóriumi értékek (éhomiz plazma glükóz, HbA1C, GOT, GPT, GGT, ALP, Kreatinin, CRP és C-peptid valamint teljes vérkép meghatározás) meghatározása mellett szolubilis szérums DPP-4 aktivitás, valamint membránhoz asszociált DPP-4 azaz a CD26 expresszió meghatározás is történt. A membránhoz kötött CD26 expressziót a CD3+ T lymphocytaokon ezen belül mind a CD4+ mind a CD8+ T lymphocyta szubpopulációkban vizsgáltuk. A T1DM-ben zajló autoimmun folyamat markereként megjelenő szigetsejt ellenes antitestek közül az ICA és a GADA markerek jelenlétét is meghatároztuk a T1DM csoportban.

A diabétesz diagnózisának felállításától eltelt idő a T1DM betegekben átlagosan: 13.4±9.76 év.

A klinikai laboratóriumi paraméterek meghatározása

A laboratóriumi paraméterek meghatározása a levett vérmintából a standard laboratóriumi meghatározásoknak megfelelően történt 37°C-on.

A szolubilis, szérums DPP-4 enzimaktivitás meghatározása

A szérums DPP-4 enzimaktivitás meghatározása mikrotábla alapú kinetikus módszerrel történt (Multiscan EX Labsystems) 405 nm-en, 25°C-on 30 perc alatt duplikátumokból. A DPP-4 specifikusan hasítja a prolin (és az alanin) utáni peptid kötések a peptid N-terminális végétől két aminosav távolságra. Ennek köszönhetően az alkalmazott Gly-Pro-paranitroanilin vegyületről egy paranitroanilin molekulát hasít le, amely 405 nm-en detektálható, és mennyisége fotometriásan meghatározható. Az enzimaktivitást 0. és 30. perc között mért abszorbancia értékekből határoztuk meg 25°C hőmérsékleten. Az enzimaktivitást nmol/ml/min-ben (U/L) határoztuk meg.

A lymphocyta membránhoz asszociált CD26 expresszió meghatározása

A CD3+ és CD4+, CD8+ T lymphocyták felszínéhez kötött CD26 expressziójának meghatározása FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) módszerrel történt. Mintaként teljes EDTA-s csőbe vett alvadásgátolt teljes vért használtunk. A sejtfelszíni markereket immunfestéssel jelöltük meg. A CD26 pozitivitást MFI-ben (mean fluorescence intensity) határoztuk meg.

A szérum ICA és GAD antitestek meghatározása ELISA kit-tel

Az ICA és a GAD antitestek meghatározása Medizym ICA és anti GAD ELISA kit (Medipan GmbH) segítségével történt szérum mintákból. A mintákat spektrofotometriás módszerrel 450nm-en detektáltuk Multiscan EX ELISA readerrel. A kiértékelést Ascent szoftverrel végeztük. Az eredmények meghatározásához a kit-ben lévő kalibrátor mintákból kapott standard görbét használtuk. Az ehhez igazított értékekből az 5 IU/ml-nél magasabb koncentrációjú mintákat pozitívnak, míg az 5 IU/ml-nél alacsonyabb értékeket negatívnak tekintettük.

Statisztikai módszerek

A kapott vizsgálati eredmények statisztikai eloszlásának meghatározása Jarque-Bera teszt elvégzésével történt. Tekintettel arra, hogy az eredmények normál eloszlást mutattak, a korrelációk vizsgálatára és az átlagértékek összehasonlítására kétmintás T-tesztet és Pearson korrelációt valamint ANOVA illetve MANOVA tesztet használtunk. A 0,05 alatti P értéket szignifikánsnak tekintettük ($p < 0,05$). A DPP-4 enzimaktivitás diagnosztikai Cutoff point meghatározására statisztikai vizsgálatként ROC (Receiver Operating Characteristic) görbe analízist használtunk.

Eredmények

Az éhomi és postprandiális szérum DPP-4 enzimaktivitás meghatározása 1-es és 2-es típusú cukorbetegekben valamint egészséges személyekben.

1. Szérum DPP-4 enzimaktivitás meghatározása cukorbetegekben éhomi állapotban:

Szignifikánsan magasabb éhomi szérum DPP-4 enzimaktivitást mértünk T1DM-ben [29.065 U/L (95%CI:27.30-30.826)] úgy az egészséges személyekhez [25.45 U/L (95%CI:24.16-26.76)] mint a T2DM betegcsoporthoz viszonyítva [24.10 U/L (95%CI:22.75-25.46)] (T1DM vs. CNTRL $p < 0.0075$; T1DM vs. T2DM $p < 0.0001$)

2. A szérum DPP-4 aktivitás változásának vizsgálata szénhidrátbevitel esetén:

Nem találtunk szignifikáns változást a szérum DPP-4 enzimaktivitásban tesztétkezést követően egyik csoporton (T1DM, T2DM, CNTRL) belül sem:

T1DM: 0': 29.07U/L, 95%CI:27.30-30.82U/L;

60': 31.33U/L, 95%CI:25.83-36.82, n=15;

180': 30.08U/L, 95%CI:25.57-34.50U/L, n=15;

T2DM: 0': 24.10U/L, 95%CI:22.75-25.46U/L;

60': 27.84U/L, 95%CI:24.6-30.9U/L, n=17;

180': 27.05U/L, 95%CI:22.82-31.27U/L, n=17;

CNTRL 0': 25.45U/L, 95%CI:24.16-26.76U/L;

60': 24.42U/L, 95%CI:24.34-27.43U/L, n=18;

180': 25.86U/L, 95%CI:24.66-29.41U/L, n=18.

3. Az éhomi szérum DPP-4 enzim aktivitás és a szénhidrát háztartással kapcsolatos klinikai laboratóriumi értékek tekintetében egyik csoporton belül sem találtunk szignifikáns korrelációt az éhomi plazma glükóz vagy HbA1C és az éhomi DPP-4 enzimaktivitás értékek között.

Az emelkedett szérumb DPP-4 aktivitás háttérének vizsgálatára irányuló, szérumb DPP-4 aktivitás és lymphocytá membránhoz kötött CD26 expresszió vizsgálata T1DM-ben.

Az éhomi, szolubilis szérumb DPP aktivitás meghatározása mellett a T lymphocyták felszínéhez kötött és a T-sejtek aktiválásában és proliferációjában is szerepet játszó CD26 expresszió meghatározása történt mind a CD3+ lymphocytá- majd ezen belül a CD4+ és CD8+ lymphocytá szubpopulációkon T1DM-ben és egészséges személyekben is:

4. Szignifikánsan magasabb éhomi szérumb DPP-4 aktivitást észleltünk ismételtén a T1DM (30,06U/L, 95%CI:21,85-45,94U/L) a CNTRL csoporthoz (22,62U/L, 95%CI: 16.32-28,28U/L) képest (ANOVA $p=8.75e-12$).

Az összes vizsgált lymphocytá populációban szignifikánsan alacsonyabb értékeket mértünk T lymphocytá membránhoz kötött CD26 expresszió tekintetében a T1DM csoportban az egészséges csoporthoz képest.

- **CD3+** lymphocytákon: T1DM:100.32MFI;95%CI:92.91-107.72; CNTRL:119.82MFI, 95%CI 107.81-131.84MFI (ANOVA $p=0.001154$)
- **CD4+** lymphocytákon: T1DM:89.29MFI, 95%CI:83.45-95.13; CNTRL:106.48MFI, 95%CI 94.97-117.99MFI (ANOVA $p=0.03294$)
- **CD8+** lymphocytákon: T1DM:110.75MFI, 95%CI 98.42-123.08; CNTRL:136.45MF, 95%CI 121.22-151.68MFI (ANOVA $p=0.00478$)

MFI: mean fluorescent intensity

5. Nem találtunk összefüggést a szérumb DPP-4 aktivitás és a lymphocyták felszínén mért membránhoz kötött CD26 expresszió között egyik vizsgált lymphocytá alpopulációban sem T1DM-ben.

CD3+ CD26: DPP-4: $r^2=0.0299$; $r=-0.1729$; $p=0.1052$

CD4+ CD26: DPP-4: $r^2=0.177$; $r=-0.1329$; $p=0.3526$

CD8+ CD26: DPP-4: $r^2=0.0042$; $r=-0,002$; $p=0.9891$

Autoimmun ICA és GADA aktivitás vizsgálata a szolubilis szérum DPP-4 valamint a lymphocyta felszínhez kötött CD26-al való összefüggésében T1DM betegekben.

6. A T1DM csoporton belül a 48 betegből 14 betegnél igazolódott izoláltan csak ICA pozitivitas, 2 esetben csak GADA pozitivitas, 27 esetben pedig mindkét autoimmun markerre pozitívak, 5 esetben mindkét markerre negatívak voltak a betegek.

7. A szérum DPP-4 aktivitás és az autoimmun markerek jelenléte között nem találtunk összefüggést egyik mért autoimmun marker esetében sem. Nem találtunk összefüggést az enzimaktivitás és az autoimmun markerek között azokban a betegekben sem, amelyek mindkét autoimmun markerre negatívnak bizonyultak. A szérum DPP-4 aktivitás azonban függetlenül az autoantitest meglététől vagy hiányától emelkedett volt.

8. Nem találtunk összefüggést az autoimmun markerek jelenléte és a lymphocyta felszíni CD26 expressziók között egyik lymphocyta szubpopuláción belül sem.

Tekintettel arra, hogy számottevő eltérést találtunk a T1DM betegek és a kontroll csoportok éhomi DPP-4 aktivitása között, annak vizsgálatára, hogy a fokozott DPP-4 aktivitás markere lehet-e az 1-es típusú diabétesznek, a DPP-4 aktivitás diagnosztikai hatékonyságának vizsgálatára ROC analízist végeztünk:

Szérum DPP-4 aktivitás, mint önálló diagnosztikai teszt az 1-es típusú diabétesz diagnózisában:

A DPP-4 aktivitás tekintetében a ROC analízissel meghatározott cutoff érték mint önálló diagnosztikai teszt: 25.91 U/L. Ezt a cutoff értéket felhasználva a DPP-4 aktivitás önálló tesztként való szenzitivitása 76.6%, specificitása 88%-os.

ICA és GAD autoantitestek, mint kombinált diagnosztikai teszt T1DM-ben:

ICA és GADA markerek kombinált diagnosztikai tesztként való alkalmazása esetén a teszt szenzitivitása 89,4.% (13.4 ± 9.76 évvel a T1DM diagnózisának felállítását követően).

ICA, GADA és szérum DPP aktivitás, mint kombináltan használt diagnosztikai teszt T1DM-ben.:

ICA, GADA markerek és szérumban DPP-4 aktivitás kombinált diagnosztikai tesztként való alkalmazása esetén a teszt szenzitivitása 95,7%.

Következtetések

Vizsgálataink alapján az valószínűsíthető, hogy a DPP-4 immunfolyamatokban játszott szerepe az autoimmun T1DM patomechanizmusában is meghatározó lehet. Eredményeink alapján a következő megállapításokra jutottunk:

1. Igazoltuk, hogy T1DM-ben minden esetben emelkedett a szérumban DPP-4 enzimaktivitás függetlenül a szénhidrát beviteltől vagy a szénhidrát anyagcsere státusztól. Ez arra utal, hogy az emelkedett szérumban DPP-4 enzimaktivitás nem az anyagcsere státusz függvényében változik.
2. Igazoltuk, hogy T1DM-ben csökkent a membránhoz kötött CD26 expresszió a T-lymphocyták felszínén. Ez összefüggésben állhat az alapfolyamat autoimmun természetével.
3. A szénhidrát anyagcsere és egyéb fontos klinikai paraméterek és a vizsgált DPP-4 szérumban enzimaktivitása, illetve T-lymphocyták sejtfelszíni expressziója között egyik vizsgált csoportban sem találtunk közvetlen összefüggést, ezért valószínűnek tűnik, hogy a tapasztalt eltérések nem a szénhidrát anyagcsere változásának függvényében változnak.
4. Igazoltuk, hogy a szérumban DPP-4 aktivitás kombinált diagnosztikai tesztként alkalmazva - abban az esetben ha a kontroll csoportba kizárólag egészséges személyeket sorolunk be - fokozza a vizsgált autoimmun markerek érzékenységét T1DM-ben, önállóan alkalmazva azonban alacsony specificitása miatt nem alkalmas a T1DM diagnosztikájára.

Tekintettel a T1DM-ben emelkedett szérumban DPP-4 enzimaktivitásra, a T-lymphocyták felszínén csökkent CD26 expresszióra, a betegség autoimmun jellegére és a fehérje immunfolyamatokban játszott szerepére az emelkedett enzimaktivitás hátterében valószínűsíthetően állhat:

1. Maga az autoimmun folyamat, amelyet a T-lymphocyták felszínén tapasztalt csökkent CD26 expresszió is megerősíthet. A csökkent expresszió a T-lymphocyták felszínén a CD26 kostimulációs szignál miatt elvben diszfunkció jele is lehet. A folyamat részét képezheti a T1DM-ben még nem teljességében feltárt regulátoros T-sejt funkciózavarnak.
2. Hormonális feedback mechanizmus, amelyben a csökkent béta-sejt tömeg és inzulintermelés megtartására illetve megvédésére irányuló fokozott inkretin (GLP-1, GIP) hormon elválasztást követheti következményesen a fokozott DPP-4 aktivitás. Az inkretinek mérésére ebben a vizsgálatban nem volt módunk.
3. Esetleges célszervkárosodás. (A vizsgálatban részt vevő betegekben nem találtunk összefüggést sem a diabéteszes retinopathia fennállása sem a microalbuminuria jelenléte sem a neuropathia kialakulása és a szolubilis illetve a membránhoz kötött DPP-4 expresszió változása között.)
4. Elméletileg szóba jövő magyarázatként felmerülhet autoimmun társbetegség (RA, Basedow- Graves, SLE) jelenléte is. Mindazonáltal jelen beválasztott vizsgált populációban ezt a feltételezést megerősíteni nem tudtuk.
5. Megelőző vírusinfekció (EBV) ill. krónikus vírusfertőzés pl: C-vírus hepatitis szintén magasabb a szérum DPP-4 enzimaktivitást eredményez. Egyes típusú diabetes kialakulásával kapcsolatban számos átvészelt vírusfertőzést (CMV, coxsackie, parvo, rota, rubeola) hoztak összefüggésbe.

Elsőként írtuk le, hogy az enterohormonális tengelyhez tartozó szérum DPP-4 aktivitása változik T1DM-ben. A magasabb szérum enzim aktivitás részleges alapjául szolgálhat esetleges későbbi klinikai vizsgálatoknak amelyekben DPP-4 gátlókat alkalmaznának.

Vizsgálataink alapján azt a következtetést vontuk le, hogy mind a szolubilis DPP-4, mind a T- lymphocytá felszínhez kötött CD26 expresszió változása jellemző T1DM-ben. Eredményeink azt mutatják, hogy mind a szérum DPP-4 enzim aktivitás, mind a T- lymphocytá felszíni CD26 expresszió vizsgálata szerepet játszhat az autoimmun T1DM immunregulációs folyamatainak szabályozásában, melyek megértése további vizsgálatokat sürget.

Közlemények

Az értekezés témájában megjelent teljes terjedelmű közlemények

1. **Varga T**, Somogyi A, Barna G, Wichmann B, Nagy G, Racz K, Selmei L, Firneisz G. (2011) Higher serum DPP-4 enzyme activity and decreased lymphocyte CD26 expression in type 1 diabetes. *Pathol Oncol Res.*17(4):925-930.
2. **Varga T**, Firneisz G, Nagy G, Somogyi A. (2010) Elevated serum dipeptidyl peptidase-4 activity in type 1 diabetes mellitus: a direct comparison. *Orv Hetil.* 151(22):899-902.
3. Firneisz G, **Varga T**, Lengyel G, Fehér J, Ghyczy D, Wichmann B, Selmei L, Tulassay Z, Racz K, Somogyi A. (2010) Serum dipeptidyl peptidase-4 activity in insulin resistant patients with non-alcoholic fatty liver disease: a novel liver disease biomarker. *PLoS One* 5(8):e12226.